



Ministero delle Attività Produttive

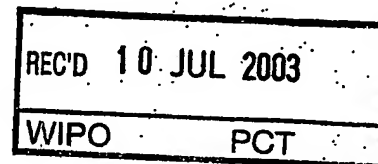
Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industria**

N. **RM2002 A 000306**



Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

20 GIU. 2003

Roma, li

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

IL DIRIGENTE

P. P. P.

di P. P. P.

Best Available Copy

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

MODULO A

marca
da
bollo

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione SIGMA-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.

Residenza Roma RM

codice

2) Denominazione ISTITUTO NAZIONALE PER LO STUDIO E CURA DEI TUMORI

Residenza Milano MI

codice

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Dott. Marco SPADARO ed altri

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza Studio Associato CAVATTONI - RAIMONDI

via le dei Parioli n. 160 città Roma

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via n. città cap (prov)

D. TITOLO

classe preposta (sez/cl/sci)

gruppo/sottogruppo

"Esteri in posizione 20 di camptotecine"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

1) Mauro MARZI

3) Claudio PISANO

cognome nome

2) Domenico ALOATTI

4) Maria Ornella TINTI

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

N° Protocollo

1) nessuna

2)

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) 12 PROV n. pag. 39

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

Doc. 2) 10 PROV n. tav. 1

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

Doc. 3) 12 RIS

lettera d'incarico, procura a difenderla, procura generale

Doc. 4) 10 RIS

designazione inventore

Doc. 5) 10 RIS

documenti di priorità con traduzione in italiano

Doc. 6) 10 RIS

autorizzazione o atto di cessione

Doc. 7) 10

nomativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale euro Duecentonovantuno/80.-

COMPILATO IL 31/05/2002

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE (I)

Dott. Marco SPADARO

obbligatorio

CONTINUA SI/NO SI

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI

CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA ARTIGIANATO E AGRICOLTURA - ROMA codice 68

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

RM 2002 A 000306

L'anno

duemiladie

il giorno

trentuno

del mese di

maggio

il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 10 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE



Ufficiale Rogante

L'UFFICIALE ROGANTE

Giuseppe Taffari

A. RICHIEDENTE (1)

Denominazione	RM 2002 A 000306		N.º
Residenza		codice	
Denominazione		codice	
Residenza		codice	
Denominazione		codice	
Residenza		codice	
Denominazione		codice	
Residenza		codice	
Denominazione		codice	
Residenza		codice	
Denominazione		codice	
Residenza		codice	

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome	cognome nome
05 Loredana VESCI	
06 Franco ZUNINO	

F. PRIORITÀ

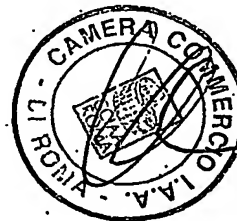
nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R

SCIOGLIMENTO RISERVE	
Data	Nº Protocollo

FIRMA DEL (1) RICHIEDENTE (1)

Dott. Marco SPADARO

SPAZIO RISERVATO ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI



RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

PROSPETTO A

NUMERO DOMANDA

REG. A

DATA DI DEPOSITO

13/05/2002

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

/ /

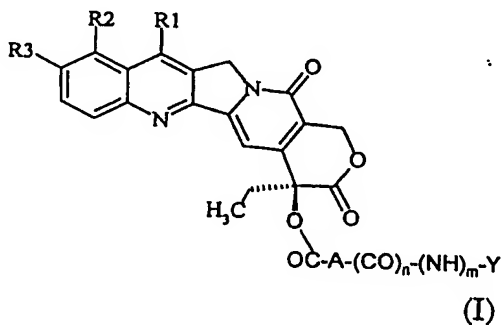
D. TITOLO

"Esteri in posizione 20 di camptotecine"

RM 2002 A 000306

L. RIASSUNTO

Sono descritti composti di formula (I)



dove i gruppi sono definiti nella descrizione che segue, le miscele racemiche, i loro singoli enantiomeri, i loro singoli diastereoisomeri, le loro miscele, i sali farmaceuticamente accettabili. Detti composti sono inibitori della Topoisomerasi (I).

M. DISEGNO



RM 2002 A 000306

Descrizione dell'invenzione avente per titolo:

"Esteri in posizione 20 di camptotecine"

a nome: SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite
S.p.A.

ISTITUTO NAZIONALE PER LO STUDIO E
CURA DEI TUMORI

di nazionalità: italiana

con sede in: Viale Shakespeare, 47 - 00144 Roma RM

Via Venezian, 1 - 20133 Milano MI

Inventori: Mauro MARZI
Domenico ALOATTI
Claudio PISANO
Maria Ornella TINTI
Loredana VESCI
Franco ZUNINO

---000---

La presente invenzione si riferisce a composti utili come
medicamenti, in particolare a derivati della camptotecina esteri in
posizione 20, a procedimenti per la loro preparazione, al loro uso
come agenti attivi ad attività inibitrice la Topoisomerasi I e a
composizioni farmaceutiche che li contengono come ingredienti
attivi.

Sfondo dell'invenzione

La camptotecina è un alcaloide isolato da Wall e al. (*J. Am.
Chem. Soc.* 88, 3888-3890 (1966)) per la prima volta dall'albero

RM 2002 A 000306

Camptoteca acuminata, una pianta originaria della Cina, della famiglia delle Nyssaceae.

La molecola consiste di una struttura pentaciclica con un latrone nell'anello E, essenziale per la citotossicità.

Per una rassegna sulle camptotecine e i problemi connessi al loro utilizzo come medicinali, nonché alla risoluzione di alcuni di tali problemi, si veda EP 1044977, a nome delle richiedenti. Tra i composti preferiti di questo brevetto va menzionata la 7-terbutossiiminometil-camptotecina, attivo per via orale. Detto composto, dotato di elevata attività, non è formulabile in composizioni liquide acquose, in particolare adatte alla via iniettabile. Il problema della solubilità delle camptotecine è ben noto agli esperti del settore.

Profarmaci solubili di camptotecine sono descritti in US 4.943.579, The United States of America, pubblicato il 24.07.1990, che fornisce esteri in 20 di camptotecine con amminoacidi direttamente legati all'idrossile dell'anello lattonico. Come discusso in questo riferimento, il problema di rendere idrosolubile la camptotecina e i suoi derivati, è reso difficoltoso dal fatto che non è possibile alterare l'anello lattonico senza perdere in attività terapeutica. Al tempo stesso, si pone il problema di ridurre comunque la tossicità tipica delle camptotecine, in particolare quella intestinale. WO 97/21865, The Stehlin Foundation, pubblicato il 07.08.1997, fornisce profarmaci di camptotecine con lo scopo di prolungare la stabilità dell'anello lattonico, che viene idrolizzato in vivo dando

luogo a un metabolita tossico e inattivo. A tal fine, il gruppo idrossi dell'anello lattonico viene esterificato con acidi carbossilici di varia lunghezza, eventualmente recanti un gruppo epossido nella catena. I composti descritti in questo riferimento sono più liposolubili, quindi vanno in una direzione diversa rispetto alla presente invenzione. *Conover C.D. e al., Anti-Cancer Drug Design (1999), 14, 499-506* descrivono un sistema di trasporto macromolecolare idrosolubile camptotecina-poliethylene glicol, nel quale diversi spaziatori di natura amminoacidica influiscono sulle sue caratteristiche farmacocinetiche e di attività antitumorale. WO 00/08033, The University of Kansas, pubblicato il 17.02.2000, descrive profarmaci idrosolubili aventi un gruppo idrossi stericamente impedito, il quale viene esterificato con un gruppo fosfonoossimetile. *Singer J.W. e al., Journal of Controlled Release, 74 (2001), 243-247*, descrivono coniugati idrosolubili di camptotecina con poli-acido glutammico-glicina. *Matsumoto H. e al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 11 (2001), 605-609* descrivono profarmaci idrosolubili di un inibitore della proteasi del virus HIV (molecola di natura dipeptidica e assolutamente lontana dalla struttura molecolare della camptotecina) e a tal fine funzionalizzano un gruppo idrossile con una porzione formata da una parte spaziatrice e una solubilizzante. La parte spaziatrice è data da un acido bicarbossilico, mentre la parte solubilizzante è data da una diammina. WO 01/09139, The Stehlin Foundation, pubblicato il 08.02.2001, descrive aril esteri della camptotecina in posizione 20, ma non si

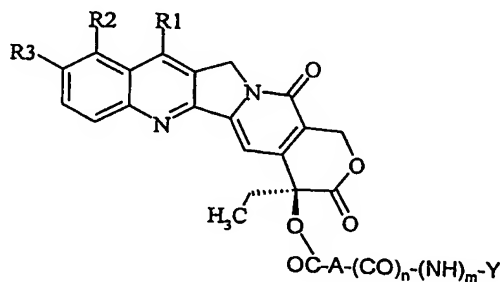
pone il problema della idrosolubilità, bensì della tossicità e della prolungata stabilità dell'anello lattonico.

Per quanto nel disegno di nuovi farmaci si affrontino vari problemi di natura chimico-fisica, quali la stabilità della molecola nel plasma o la sua idrosolubilità a scopi formulativi, vi è la costante ricerca di un migliore indice terapeutico.

Riassunto dell'invenzione

È stato ora sorprendentemente trovato che esteri in posizione 20 di camptotecine, in particolare le camptotecine recanti in posizione 7 un gruppo ossima, come descritto nel summenzionato EP 1044977, sono dotate di elevata attività antitumorale. Tali composti hanno un migliore indice terapeutico.

Pertanto sono oggetto della presente invenzione composti di formula generale (I)



dove:

A è C₁-C₈ alchile lineare o ramificato saturo o insaturo, C₃-C₁₀ cicloalchile, C₃-C₁₀ cicloalchile-C₁-C₈ alchile lineare o ramificato; quando n e m sono uguali a 1, allora Y è C₁-C₈ alchile lineare o ramificato saturo o insaturo sostituito con NR₁₂R₁₃ o N⁺R₁₂R₁₃R₁₄, dove R₁₂, R₁₃ e R₁₄, uguali o diversi fra loro, sono idrogeno o C₁-C₄ alchile



lineare o ramificato, oppure Y è BCOOX, dove B è un residuo di un amminoacido, X è H, C₁-C₄ alchile lineare o ramificato, benzile o fenile, sostituiti nelle posizioni disponibili con almeno un gruppo scelto tra C₁-C₄ alcossi, alogeno, nitro, ammino, C₁-C₄ alchile, oppure se n e m sono entrambi 0;

Y è 4-trimetilammonio-3-idrossi-butanoil, sia sotto forma di sale interno, sia sotto forma di sale con un anione di un acido farmaceuticamente accettabile, oppure Y è N⁺R₁₂R₁₃R₁₄, come definiti sopra;

R₁ è idrogeno oppure un gruppo -C(R₅)=N-O-R₄, nel quale R₄ è idrogeno oppure un gruppo C₁-C₅ alchile o C₁-C₅ alchenile, lineare o ramificato, o C₃-C₁₀ cicloalchile, o (C₃-C₁₀) cicloalchile - (C₁-C₅) alchile lineare o ramificato, o C₆-C₁₄ arile, o (C₆-C₁₄) arile - (C₁-C₅) alchile lineare o ramificato, o un gruppo eterociclico o eterociclo - (C₁-C₅) alchile lineare o ramificato, detto gruppo eterociclico contenente almeno un eteroatomo scelto fra atomo di azoto, eventualmente sostituito con un gruppo (C₁-C₅) alchile, e/o ossigeno e/o zolfo; detti gruppi alchile, alchenile, cicloalchile, cicloalchilalchile, arile, arile-alchile, eterociclico o eterociclo-alchile, potendo essere eventualmente sostituiti con uno o più gruppi scelti fra: alogeno, idrossi, C₁-C₅ alchile, C₁-C₅ alcossi, fenile, ciano, nitro, -NR₆R₇, dove R₆ e R₇, uguali o diversi fra loro sono idrogeno, (C₁-C₅) alchile lineare o ramificato, il gruppo -COOH o un suo estere farmaceuticamente accettabile; oppure il gruppo -CONR₈R₉, dove R₈ e R₉, uguali o diversi fra loro sono idrogeno, (C₁-C₅) alchile

lineare o ramificato; oppure R_4 è un residuo (C_6-C_{10}) aroile o (C_6-C_{10}) arilsolfonile, eventualmente sostituito con uno o più gruppi scelti fra: alogeno, idrossi, C_1-C_5 alchile lineare o ramificato, C_1-C_5 alcossi lineare o ramificato, fenile, ciano, nitro, $-NR_{10}R_{11}$, dove R_{10} e R_{11} , uguali o diversi fra loro sono idrogeno, C_1-C_5 alchile lineare o ramificato; oppure R_4 è un residuo poliamminoalchile; oppure R_4 è un residuo glicosilico; R_5 è idrogeno, C_1-C_5 alchile, lineare o ramificato, C_1-C_5 alchenile, lineare o ramificato, C_3-C_{10} cicloalchile, (C_3-C_{10}) cicloalchile - (C_1-C_5) alchile lineare o ramificato, C_6-C_{14} arile, (C_6-C_{14}) arile - (C_1-C_5) alchile lineare o ramificato; R_2 e R_3 , uguali o diversi fra loro sono idrogeno, ossidrile, C_1-C_5 alcossi, lineare o ramificato; gli N1-ossidi, le miscele racemiche, i loro singoli enantiomeri, i loro singoli diastereoisomeri, le loro miscele, i sali farmaceuticamente accettabili.

La presente invenzione comprende l'uso dei composti della sopraddezza formula (I) come principi attivi per medicamenti, in particolare per medicamenti utili come inibitori della Topoisomerasi I. Tra le applicazioni terapeutiche derivanti dall'attività di inibizione della Topoisomerasi I, si menzionano i tumori, le infezioni da parassiti o da virus.

La presente invenzione comprende composizioni farmaceutiche contenenti composti di formula (I) come principi attivi, in miscela con veicoli ed eccipienti farmaceuticamente accettabili.

La presente invenzione comprende anche i processi per la preparazione di composti di formula (I).

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Nell'ambito della presente invenzione, come esempi di gruppo C_1-C_8 alchile lineare o ramificato, sono intesi metile, etile, propile, butile, pentile, esile, eptile e ottile e i loro possibili isomeri, quali ad esempio isopropile, isobutile, ter-butile.

Esempi di gruppo C_1-C_5 alchenile, lineare o ramificato, sono metilidene, etilidene, vinile, allile, propargile, butilene, pentilene, dove il doppio legame carbonio-carbonio può essere situato nelle diverse possibili posizioni della catena alchilenica, la quale può anche essere ramificata nell'ambito dell'isomeria consentita.

Esempi di gruppo C_3-C_{10} cicloalchile sono ciclopropile, ciclobutile, ciclopentile, cicloesile, cicloottile, gruppi policiclici, quali ad esempio adamantile.

Esempi di gruppo (C_3-C_{10}) cicloalchile - (C_1-C_8) alchile lineare o ramificato sono ciclopropilmetile, 2-ciclopropiletile, 1-ciclopropiletile, 3-ciclopropilpropile, 2-ciclopropilpropile, 1-ciclopropilpropile, ciclobutilmetile, 2-ciclobutiletile, 1-ciclobutiletile, 3-ciclobutilpropile, 2-ciclobutilpropile, 1-ciclobutilpropile, cicloesilmetile, 2-cicloesiletile, 1-cicloesiletile, 3-cicloesilpropile, 2-cicloesilpropile, 1-cicloesilpropile, 5-cicloesilpentile, 3-cicloesilpentile, 3-metil-2-cicloesilbutile, 1-adamantiletile, 2-adamantiletile, adamantilmetile.

Esempi di gruppo (C_6-C_{14}) arile, o (C_6-C_{14}) arile - (C_1-C_6) alchile lineare o ramificato, sono fenile, 1- o 2-naftile, antracenile, benzile, 2-feniletile 1-feniletile, 3-fenilpropile, 2-antracenilpropile,

1-antracenilpropile, naftilmetile, 2-naftiletile, 1-naftiletile, 3-naftilpropile, 2-naftilpropile, 1-naftilpropile, cicloesilmetile, 5-fenilpentile, 3-fenilpentile, 3-metil-2-fenilbutile.

Esempi di gruppo eterociclico o eterociclo - (C_1-C_5) alchile lineare o ramificato sono tienile, chinolile, piridile, N-metilpiperidinile, 5-tetrazolile, 2-(4,5-diidrossazolile), 1,2,4-ossadiazolidin-3-il-5-one, basi puriniche e pirimidiniche, ad esempio uracile, eventualmente sostituiti come indicato nelle definizioni generali di cui sopra.

Esempi di gruppi (C_6-C_{10}) aroile sono benzoile, naftoile.

Esempi di gruppi (C_6-C_{10}) arilsolfonile sono tosile, benzoilsolfonile.

Per alogeno si intende fluoro, cloro, bromo, iodio.

Esempi di gruppi sostituiti sono pentafluorofenile, 4-fenilbenzile, 2,4-difluorobenzile, 4-amminobutile, 4-idrossibutile, dimetilamminoetile, p-nitrobenzoile, p-cianobenzoile.

Esempi di residuo poliamminoalchile è $-(CH_2)_m-NR_{15}-(CH_2)_p-NR_{16}-(CH_2)_q-NH_2$, dove m, p e q sono un numero intero da 2 a 6, estremi compresi e R_{15} e R_{16} sono un gruppo (C_1-C_5) alchile lineare o ramificato, ad esempio 4-amminobutil-2-amminoetile, 3-amminopropil-4-amminobutile, 3-amminopropil-4-amminobutil-3-amminopropile.

Esempi di residuo glicosilico sono 6-D-galattosile, 6-D-glucosile.



Per amminoacido si intende la generica definizione di un composto organico recante almeno un residuo carbossilico e almeno un residuo amminico. Esempi di residuo di un amminoacido sono gli amminoacidi naturali, nelle possibili forme enantiomeriche, tra questi sono preferiti glicina, alanina, fenilalanina, valina, leucina, isoleucina, acido aspartico, acido glutammico, lisina, arginina, tirosina; acido γ -amminobutirrico, tutti gli amminoacidi potendo essere eventualmente salificati sul carbossile libero e/o sul gruppo basico libero con basi o acidi farmaceuticamente accettabili.

Esempi di sali farmaceuticamente accettabili sono, nel caso di atomi di azoto a carattere basico, i sali con acidi farmaceuticamente accettabili, sia inorganici, sia organici, quali ad esempio, acido cloridrico, acido solforico, acido acetico, oppure, nel caso di gruppo acido, quale carbossile, i sali con basi farmaceuticamente accettabili, sia inorganiche, sia organiche, quali ad esempio, idrossidi alcalini e alcalino-terrosi, idrossido di ammonio, ammine, anche eterocicliche. Nel caso di Y uguale a 4-trimetilammonio-3-idrossi-butanoil, sali farmaceuticamente accettabili sono noti e ampiamente descritti, ad esempio in WO 00/06134.

Un primo gruppo di composti preferiti comprende i composti di formula (I) nei quali n e m sono uguali a 1.

Un secondo gruppo di composti preferiti comprende i composti di formula (I) nei quali n e m sono entrambi 0.

Nell'ambito dei due gruppi preferiti, sopra menzionati, sono preferiti i composti di formula (I), nei quali R_4 è diverso da idro-

geno, in particolare è un gruppo C_1-C_5 alchile o C_1-C_5 alchenile, lineare o ramificato, o C_3-C_{10} cicloalchile, o (C_3-C_{10}) cicloalchile - (C_1-C_5) alchile lineare o ramificato, o C_6-C_{14} arile, o (C_6-C_{14}) arile - (C_1-C_5) alchile lineare o ramificato, o un gruppo eterociclico o eterociclo - (C_1-C_5) - alchile lineare o ramificato, detto gruppo eterociclico contenente almeno un eteroatomo scelto fra atomo di azoto, eventualmente sostituito con un gruppo (C_1-C_5) alchile, e/o ossigeno e/o zolfo; detti gruppi alchile, alchenile, cicloalchile, arile, arile-alchile, eterociclico o eterociclo-alchile, potendo essere eventualmente sostituiti con uno o più gruppi scelti fra: alogeno, idrossi, C_1-C_5 alchile, C_1-C_5 alcossi, fenile, ciano, nitro, $-NR_6R_7$, dove R_6 e R_7 , uguali o diversi fra loro sono idrogeno, (C_1-C_5) alchile lineare o ramificato; il gruppo $-COOH$ o un suo estere farmaceuticamente accettabile; oppure il gruppo $-CONR_8R_9$, dove R_8 e R_9 , uguali o diversi fra loro sono idrogeno, (C_1-C_5) alchile lineare o ramificato, secondo le definizioni esemplificative fornite sopra.

Un gruppo di composti particolarmente preferiti comprende:

(E)-7-tert-butossiimminometil-20-O-(4-trimetilammonio-3-idrossi)butanoil-camptotecina bromuro (ST2204);

(E)-7-tert-butossiimminometil-20-O-(4-trimetilammonio)butanoil-camptotecina bromuro (ST2200);

(E)-7-tert-butossiimminometil-20-O-emisuccinil-camptotecina;

(E)-7-tert-butossiimminometil-20-O-[2-(dimetilammino)etil-ammino]succinilcamptotecina cloridrato (ST1657);

20-O-(benzilglicil)succinil-camptotecina (ST1451);

20-O-(tert-butilglicil)succinil-camptotecina bromuro
(ST1453);

7-tert-butossiimmunometil-20-O-(tert-butilglicil)succinil-
camptotecina (ST1616);

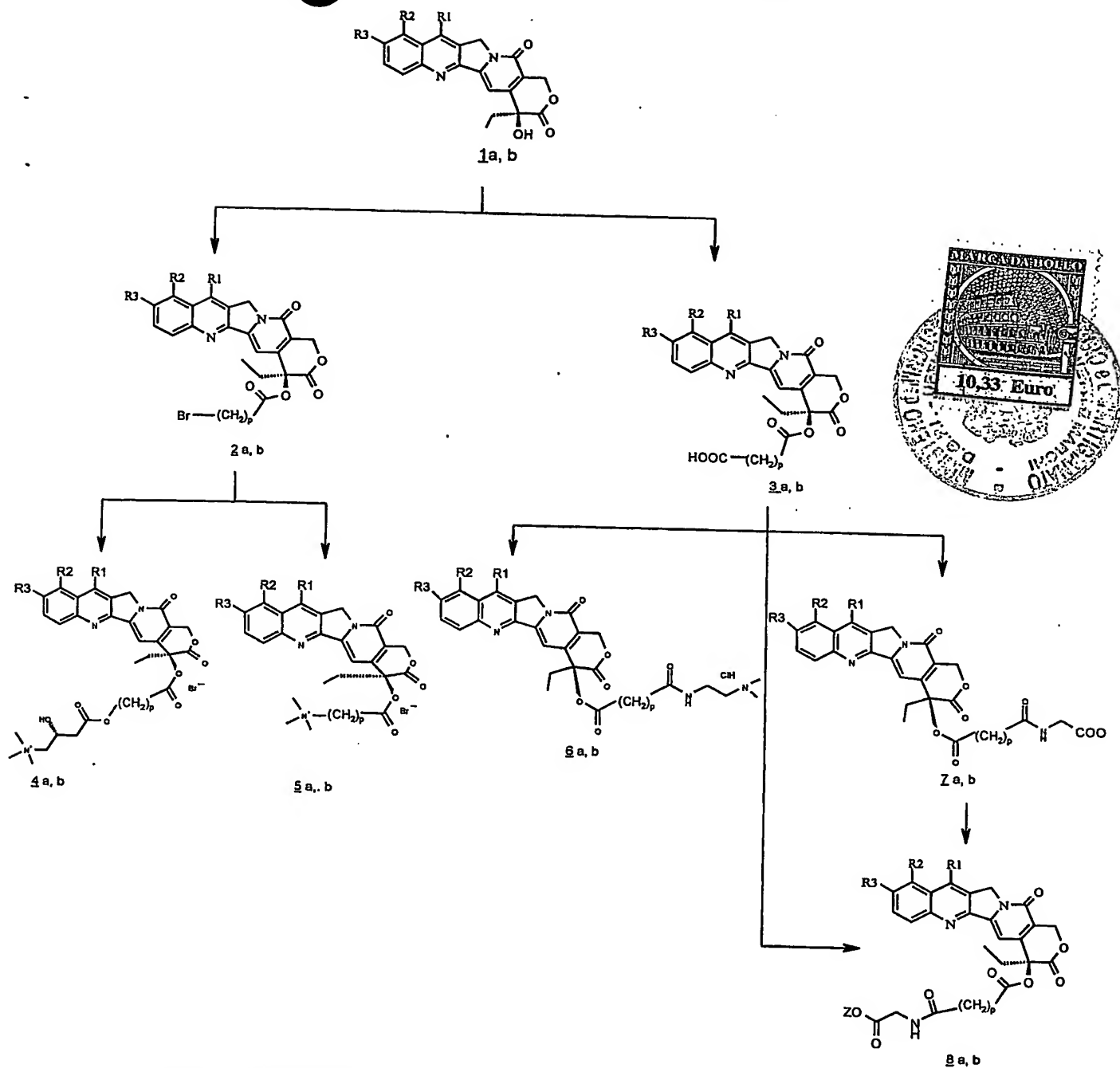
20-O-(glicil)succinil-camptotecina (ST1452);

20-O-(2-metossifenilglicil)succinil-camptotecina (ST1454);

7-tert-butossiimmunometil-20-O-(2-metossi-fenilglicil)succi-
nil-camptotecina (ST1617).

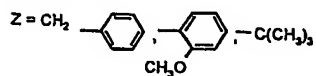
I composti di formula (I) possono essere preparati con il pro-
cedimento descritto di seguito ed esemplificato per i composti pre-
feriti dell'invenzione.

13



a) $R_3 = R_2 = H$, $R_1 = CHNOC(CH_3)_3$

b) $R_3 = R_2 = R_1 = H$



p = 1-8

È del tutto evidente per il tecnico avente ordinaria esperienza del settore che lo schema del procedimento si applica alla totalità dei composti compresi nella formula (I), essendo completamen-

te descritto il metodo per ottenere i composti di partenza nel summenzionato brevetto EP 1044997.

In termini generali, i composti di formula (I), dove n e m sono 0, si ottengono attraverso un procedimento che comprende:

a) reazione della camptotecina, eventualmente sostituita con i gruppi R₁, R₂ e R₃ definiti sopra, con un acido carbossilico recante in ω un gruppo uscente, a dare il relativo estere in 20;

b) sostituzione del gruppo uscente con il gruppo Y.

In termini generali, i composti di formula (I), dove n e m sono 1, si ottengono attraverso un procedimento che comprende:

a) reazione della camptotecina, eventualmente sostituita con i gruppi R₁, R₂ e R₃ definiti sopra, con un acido bicarbossilico avente da 3 a 11 atomi di carbonio, a dare il relativo emiestere in 20;

b) trasformazione del gruppo carbossilico libero di detto emiestere nella relativa ammido -NH-Y.

Procedura generale

Preparazione dell'intermedio 2a,b

I prodotti descritti nello schema di sintesi si ottengono per reazione della camptotecina 1a,b sciolta in una miscela di solvente aprotico, quale ad esempio DMF o solventi alogenati o eterici, e in presenza di basi organiche o inorganiche non acquose quali ammine terziarie o K₂CO₃ o in presenza della sola base nel caso in cui questa sia liquida alla temperatura di reazione, ad una temperatura tra -10 e +80°C, vengono aggiunti da 2 a 30 equivalenti di

acidi carbossilici variamente attivati e recanti tutti in ω un gruppo quale uscente OTs, Cl, Br, I.

Preparazione dell'intermedio 3a,b

Ad una miscela della camptotecina 1a,b sciolta in una miscela di solvente aprotico, quali ad esempio DMF o solventi alogenati o eterici, ed in presenza di basi organiche o inorganiche non acquose quali ammine terziarie o K_2CO_3 o in presenza della sola base nel caso in cui questa sia liquida alla temperatura di reazione, ad una temperatura tra -10 e $+80^\circ C$, vengono aggiunti da 2 a 30 equivalenti di acido carbossilico attivato come alogenuro acilico o come anidride o anidride mista o imidazolide.

Il solvente viene rimosso sotto vuoto ed il prodotto purificato per cromatografia.

Preparazione degli intermedi 4a,b e 5a,b

All'intermedio 2a,b sciolto in una miscela di solvente aprotico, quali ad esempio DMF o THF o solventi alogenati o eterici, ed in presenza di basi organiche o inorganiche non acquose quali ammine terziarie o K_2CO_3 o in presenza della sola base nel caso in cui questa sia liquida alla temperatura di reazione, ad una temperatura tra $+20$ e $+80^\circ C$, vengono aggiunti da 2 a 30 equivalenti di alchil carbossilati opportunamente sostituiti o di ammine opportunamente sostituite $NR_{12}R_{13}R_{14}$ e la reazione prosegue per tempi compresi fra 15-36 ore.

Il solvente viene rimosso sotto vuoto ed il prodotto purificato per cromatografia o per cristallizzazione.

Preparazione dell'intermedio 6a,b

All'intermedio 3a,b, attivato come alogenuro acilico o come anidride o anidride mista o imidazolide, sciolto in una miscela di solvente aprotico, quali ad esempio DMF o THF o solventi alogenati o eteri, ed in presenza di basi organiche o inorganiche non acquose quali ammine terziarie o K_2CO_3 o in presenza della sola base nel caso in cui questa sia liquida alla temperatura di reazione, ad una temperatura tra $+20$ e $+80^\circ C$, vengono aggiunti da 2 a 30 equivalenti di alchil ammine opportunamente sostituite e la reazione prosegue per tempi compresi fra 15- 36 ore.

Il solvente viene rimosso sotto vuoto ed il prodotto purificato per cromatografia o per cristallizzazione

Preparazione dell'intermedio 7a,b

All'intermedio 3a,b, attivato come alogenuro acilico o come anidride o anidride mista o imidazolide, sciolto in una miscela di solvente aprotico, quali ad esempio DMF o THF o solventi alogenati o eteri, ed in presenza di basi organiche o inorganiche non acquose quali ammine terziarie o K_2CO_3 o in presenza della sola base nel caso in cui questa sia liquida alla temperatura di reazione, ad una temperatura tra $+20$ e $+80^\circ C$, vengono aggiunti da 2 a 30 equivalenti di amminoacidi e la reazione prosegue per tempi compresi fra 15- 36 ore. Il solvente viene rimosso sotto vuoto ed il prodotto purificato per cromatografia o per cristallizzazione.

Preparazione di 8a,b

L'intermedio 7a,b, è sciolto in solventi aprotici quali ad es. DMF, solventi alogenati, solventi eteri. Alla soluzione così ottenuta sono aggiunti da 2 a 20 equivalenti di un alcool alifatico o aromatico, da 2 a 10 equivalenti di base e un eccesso da 2 a 10 equivalenti di agente condensante come ad esempio DCC, EDC. La reazione viene tenuta a temperatura compresa fra 25-50 °C per un tempo compreso fra 4 e 24 ore. Il prodotto purificato per cromatografia. Il prodotto 8a,b viene anche ottenuto direttamente da 3a,b utilizzando un'amminoacido esterificato.

Sali farmaceuticamente accettabili sono ottenuti con metodi convenzionali di letteratura, e non necessitano di ulteriore descrizione.

I composti descritti nella presente invenzione sono inibitori della Topoisomerasi I e pertanto sono utili come medicinali, in particolare per il trattamento di patologie che beneficiano dell'inibizione di detta Topoisomerasi. In particolare, i composti della presente invenzione mostrano attività antiproliferativa, quindi sono utilizzati per la loro attività terapeutica, e possiedono proprietà chimico-fisiche che li rende adatti alla formulazione in composizioni farmaceutiche.

Le composizioni farmaceutiche comprendono almeno un composto di formula (I) come principio attivo, in una quantità tale da produrre un significativo effetto terapeutico. Le composizioni comprese nella presente invenzione sono del tutto convenzionali e sono ottenute con metodi di comune prassi nell'industria farma-



ceutica. A seconda della via di somministrazione scelta, le composizioni saranno in forma solida o liquida, adatte alla via orale, parenterale, endovenosa. Le composizioni secondo la presente invenzione comprendono assieme al principio attivo almeno un veicolo o eccipiente farmaceuticamente accettabile. Possono essere particolarmente utili coadiuvanti di formulazione, ad esempio solubilizzanti, disperdenti, agenti di sospensione, emulsionanti. Sono indicate le composizioni acquose.

I composti di formula (I) possono essere anche usati in associazione con altri principi attivi, ad esempio altri farmaci antitumorali o altri farmaci ad attività antiparassitaria o antivirale, sia in forme separate, sia in una unica forma di dosaggio.

I composti secondo la presente invenzione sono utili come medicinali ad attività antitumorale, ad esempio nei tumori del polmone, come il tumore polmonare non microcitoma, tumori del colon-retto, della prostata, gliomi.

L'attività citotossica dei composti della presente invenzione è stata saggiata in sistemi cellulari di cellule tumorali umane, usando la prova di attività antiproliferativa come metodo di valutazione del potenziale citotossico.

La linea cellulare utilizzata è un adenocarcinoma polmonare non microcitoma, denominata NCI H460, che appartiene alla classe dei NSCLC (non small cell lung cancer).

Attività antitumorale

Per valutare l'effetto dei composti secondo la presente invenzione, venne valutata la citotossicità verso la linea di tumore polmonare umano non microcitoma (NCI-H460). Le cellule provenienti da American Type Culture Collection (ATCC) vennero mantenute in coltura in RPMI 1640 (GIBCO) contenente siero fetale bovino al 10% e gentamicina solfato ad una concentrazione 50 µg/ml.

Le cellule vennero seminate in un volume di 250 µl in piastre da 96 pozzetti ed incubate per 24 ore a 37°C. Il giorno successivo vennero aggiunti i composti in esame a concentrazioni scalfari da 1 µM a 0,004 µM, e le cellule vennero incubate per altre 2 ore a 37 °C in atmosfera umidificata contenente CO₂ al 5%. Le cellule vennero lavate per 3 volte, ogni volta capovolgendo le piastre ed aggiungendo PBS. Vennero aggiunti 200 µl/pozzetto di terreno RPMI 1640 contenente FCS 10% e le piastre vennero incubate a 37 °C per ulteriori 72 ore. Al 5° giorno, il medium di crescita venne rimosso mediante capovolgimento, vennero aggiunti 200 µl/pozzetto di PBS e 50 µl di TCA all'80% freddo. Le piastre vennero quindi messe ad incubare in ghiaccio per almeno 1 ora. Il TCA venne rimosso per capovolgimento, le piastre vennero lavate 3 volte per immersione in acqua distillata ed asciugate prima su carta, poi con un getto di aria calda. In tutti i pozzetti vennero aggiunti 200 µl di sulforodamina B allo 0,4% in acido acetico all'1%. Le piastre vennero incubate a temperatura ambiente per altri 30 minuti. La sulforodamina B venne rimossa per capovolgimento, le piastre

vennero lavate per immersione in acido acetico all'1% per 3 volte, quindi vennero asciugate prima su carta assorbente, poi con un getto di aria calda. In tutti i pozzetti vennero aggiunti 200 μ l di Tris base 10 mM e le piastre vennero messe sotto agitazione per almeno 20 min. La densità ottica venne rilevata mediante uno spettrofotometro Multiskan a 540 nm.

In Tabella 1 vengono mostrati i valori di IC₅₀, ossia la concentrazione in grado di inibire il 50% della sopravvivenza cellulare, per ciascun composto in esame elaborati con un software ALLFIT.

TABELLA 1

Prodotto	NCI-H460 IC ₅₀ (μ M)
ST1451	0.15
ST1452	1.6
ST1453	0.26
ST1454	0.16
ST1616	0.004
ST1617	0.029
ST1657	0.012
ST2200	0.017
ST2204	0.041

I seguenti esempi illustrano ulteriormente l'invenzione, facendo riferimento allo schema sopra riportato.

ESEMPIO 1

(E)-7-tert-butossiimmunometil-20-O-(4-bromo)-butirril-
camptotecina (2a)

In un pallone, tenuto al riparo dalla luce, sono stati caricati 2 g (4,5 mmoli) di 7-tert-butossiimmunometil-camptotecina (1a) e 25mL di piridina, la miscela è stata raffreddata in bagno a ghiaccio e si sono quindi aggiunti, goccia a goccia, 4,5mL (38,9mmoli, 8,6 eq.) di 4-bromo butirril cloruro. Dopo 3 ore la miscela di reazione è stata portata a secco e quindi purificata per cromatografia flash su colonna (CH₂Cl₂/Acetone 98:2) per dare 1,26 g (2,1 mmoli, 46,7%) di prodotto ($T_{dec} = 212^{\circ}\text{C}$).

$R_f = 0,61$ (CH₂Cl₂/Diossano 95:5).

MS (IS): $[MH]^+ = 596.2, 598.2$; $[M+Na]^+ = 618.2, 620.2$; $[M-1]^- = 594.0, 596.0$

Analisi elementare: Calcolato: C 58.29, H 5.19, N 7.04;

Trovato C 58.25, H 5.18, N 7.03.

¹H NMR (300 MHz, DMSO, δ): 0,95-1,00 (t, 3H, CH₃), 1,50 (s, 9H, t-Bu), 1,95-2,20 (m, 4H, 2xCH₂), 2,65-2,75 (t, 2H, CH₂), 3,50-3,60 (t, 2H, CH₂), 5,30 (s, 2H, CH₂), 5,50 (s, 2H, CH₂), 7,10 (s, 1H, CH), 7,65-7,75 (t, 1H, CH), 7,85-7,95 (t, 1H, CH), 8,10-8,20 (d, 1H, CH), 8,50-8,60 (d, 1H, CH), 9,20 (s, 1H, CH).

¹³C NMR (75.4 MHz, DMSO, δ):

8,1; 28,4; 28,2; 28,1; 31,0; 31,5; 33,8; 34,2; 45,9; 53,6; 65,4; 77,8;
82,1; 96,4; 120,4; 125,8; 126,5; 127,3; 129,8; 130,4; 131,2; 133,0;
144,5; 146,3; 147,7; 149,4; 153,8; 157,0; 168,0; 172,5.



ESEMPIO 2

(E)-7-tert-butoossiiminometil-20-O-(4-trimetilammonio-3-idrossi)butanoil-camptotecina bromuro (4a) ST2204

Ad una soluzione di 510 mg (0,86 mmoli) di (E)-7-tert-butoossiiminometil-20-O-(4-bromo)-butiril-camptotecina (2a) in 10 mL di DMF anidra sono stati aggiunti 906 mg (5,6 mmoli, 6,5 eq.) di L-carnitina sale interno; la miscela così ottenuta è stata agitata a temperatura ambiente e al riparo dalla luce. Dopo 16h la reazione mostra una conversione del 40%, si sono quindi aggiunti 600 mg (3,7 mmoli, 4,3 eq.) di L-carnitina sale interno. Dopo altre 20 h la carnitina in eccesso è stata eliminata, dopo aver diluito la miscela con 15 mL di CH₂Cl₂, con un lavaggio acquoso (4mL). La fase organica risultante è stata dibattuta con 10 mL di H₂O per riprendere il prodotto ed eliminare le impurezze lipofile in CH₂Cl₂. Sono stati ottenuti 161 mg (0,21 mmoli, 24%) di un solido giallo (T_{dec.} = 189°C). R_f = 0,38 (CH₂Cl₂/CH₃OH 7:3).

MS (IS): M⁺ = 677,4

Analisi elementare: Calcolato: C 57,02, H 5,93, N 7,39;

Trovato: C 56,98, H 5,92, N 7,38. (2%H₂O).

¹H NMR (300 MHz, DMSO, δ): 0,90-1,00 (t, 3H, CH₃), 1,50 (s, 9H, t-Bu), 1,80-1,95 (quintetto, 2H, CH₂), 2,10-2,20 (q, 2H, CH₂), 2,60-2,70 (t, 2H, CH₂), 3,10 (s, 9H, NMe₃), 3,20-3,40 (t, 4H, 2x CH₂), 4,05-4,15 (t, 2H, CH₂), 4,35-4,45 (m, 1H, CH), 5,30 (s, 2H, CH₂), 5,50 (s, 2H, CH₂), 7,10 (s, 1H, CH),

7,70-7,80 (t, 1H, CH), 7,85-7,95 (t, 1H, CH), 8,15-8,20 (d, 1H, CH), 8,55-8,65 (d, 1H, CH), 9,30 (s, 1H, CH).

^{13}C NMR (75,4 MHz, DMSO, δ): 8,2; 24,2; 28,0; 28,2; 30,5; 31,0; 53,3; 54,1; 62,9; 63,5; 63,7; 67,0; 69,9; 76,6; 81,3; 95,3; 119,7; 125,0; 125,8; 127,3; 129,0; 130,4; 131,2; 132,6; 144,3; 146,0; 146,5; 149,4; 153,0; 157,1; 168,0; 170,7; 172,3.

ESEMPIO 3

(E)-7-tert-butosiiminometil-20-O-(4-trimetilammonio)butanoil-camptotecina bromuro (5a) ST2200

In una soluzione di 500 mg (0,84 mmoli) di (E)-7-tert-butosiiminometil-20-O-(4-bromo)-butiril-camptotecina (2a) in 10 mL di THF è stata fatta gorgogliare trimetilammina gassosa per 15 h a temperatura ambiente e al riparo dalla luce. Il THF è stato quindi rimosso per evaporazione ed il prodotto è stato purificato per ric precipitazione con etere etilico da una soluzione metanolica. Ottenuti 300 mg (0,46 mmoli, 54,7%) di prodotto come un solido giallo ($T_{\text{dec}} = 212^\circ\text{C}$). $R_f = 0,38$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 7:3).

MS (IS): $M^+ = 575,4$.

Analisi elementare: Calcolato: C 58,57, H 5,95, N 8,54;

Trovato: C 58,53, H 5,94, N 8,53. (1% H_2O).

^1H NMR (300 MHz, DMSO, δ): 0,95-1,00 (t, 3H, CH_3), 1,50 (s, 9H, t-Bu), 1,90-2,00 (m, 2H, CH_2), 2,15-2,25 (q, 2H, CH_2), 2,60-2,80 (m, 2H, CH_2), 3,00 (s, 9H, NMe_3), 3,25 (m, 2H, CH_2), 5,40 (s, 2H, CH_2), 5,50-6,00 (d, 2H, CH_2), 7,10 (s, 1H,

CH), 7,70-7,80 (t, 1H, CH), 7,85-7,95 (t, 1H, CH), 8,10-8,20 (d, 1H, CH), 8,55-8,65 (d, 1H, CH), 9,30 (s, 1H, CH).

^{13}C NMR (75,4 MHz, DMSO, δ):

8,1; 18,4; 28,6; 20,2; 21,3; 53,6; 54,8; 65,4; 67,2; 77,3; 79,0; 82,1; 96,5; 120,2; 125,8; 126,0; 128,0; 129,5; 130,1; 131,5; 133,2; 144,2; 146,1; 147,0; 149,5; 153,0; 157,9; 168,0; 172,9.

ESEMPIO 4

(E)-7-tert-butossiiminometil-20-O-emisuccinil-camptotecina (3a)

In un pallone tenuto al riparo dalla luce, sono stati sciolti 6 g (13,4 mmoli) di 7-tert-butossiiminometil-camptotecina (1a), 26,82 g (268 mmoli) di anidride succinica e 600 mg (4,9 moli) di 4-dimetilammino piridina in 60 mL di piridina anidra; la miscela così ottenuta è stata posta in agitazione a $T = 60^\circ\text{C}$. Dopo 22 h il solvente è stato rimosso per evaporazione ed il residuo ripreso con CH_2Cl_2 . La fase organica è stata dibattuta con HCl 0,5% (2x20 mL) e seccata su Na_2SO_4 anidro.

Il grezzo di reazione è stato purificato per cromatografia su gel di silice con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 95:5 \rightarrow 9:1 per dare 5,3 g (9,7 mmoli, 72,4%) di prodotto.

MS (IS): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 548,3$.

Analisi elementare: Calcolato: C 63,62, H 5,30, N 7,68;

Trovato: C 63,59, H 5,29, N 7,67.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ): 0,95-1,05 (t, 3H, CH_3), 1,50 (s, 9H, t-Bu), 2,10-2,30 (m, 4H, 2x CH_2), 2,90-3,10 (m, 2H, CH_2),

5,35-5,45 (d, 2H, CH₂), 5,70-5,80 (d, 2H, CH₂), 7,40 (s, 1H, CH), 7,65-7,75 (d, 2H, 2xCH), 8,10-8,20 (d, 2H, 2xCH), 8,90 (s, 1H, CH).

¹³C NMR(75,4 MHz, CDCl₃, δ): 8,1; 28,0; 30,2; 32,0; 52,1; 67,0; 82,4; 120,6; 122,1; 124,7; 125,5; 128,2; 129,1; 142,7; 144,0; 146,4; 147,3; 151,5; 156,8; 167,2; 172,9; 174,4.

ESEMPIO 5

(E)-7-tert-butossiiminometil-20-O-[2-(dimetilamino)etil-ammino]succinilcamptotecina cloridrato (6a) ST1657

L'intermedio 3a (3 gr 5,48 mmoli) è stato sciolto in 60 ml di CH₂Cl₂ anidro (60 ml). Alla soluzione, raffreddata in bagno a ghiaccio, sono stati aggiunti 22 ml di ossalil cloruro. Terminata l'aggiunta è stato tolto il bagno raffreddante e la reazione è stata lasciata a temperatura ambiente per 8 ore. Successivamente, la reazione è stata lavorata allontanando il solvente e l'eccesso di ossalil cloruro e poi lavando ripetutamente aggiungendo ed evaporando il CH₂Cl₂ anidro. (si decompone l'eventuale acido ossalico rimasto).

Il grezzo di reazione (un solido rosso) (3,1 g) è stato utilizzato nella reazione successiva tal quale, senza ulteriori purificazioni.

In un pallone munito di imbuto di gocciolamento sono stati sciolti 3,4 g (6 mmoli) del cloruro acido grezzo precedentemente descritto in 80 ml di CH₂Cl₂ anidro. Alla soluzione risultante, tenuta a 0°C, è stata gocciolata una soluzione di 1 ml di N,N-dimetil-etilendiammina e 1,25 ml di TEA in 10 ml di CH₂Cl₂. Dopo due ore dall'aggiunta, la reazione è stata controllata. La reazione è stata



lavorata aggiungendo un'altra aliquota di CH_2Cl_2 e poi dibattendo con più porzioni di acqua.. La fase organica risultante è stata seccata su Na_2SO_4 anidro. e concentrata ottenendo 4,6 g di un solido rosso che è stato quindi purificato. Al solido ridiscioltto in CH_2Cl_2 fu aggiunto HCl gassoso disciolto in THF. La soluzione, dopo 10 min di agitazione, è stata concentrata al rotavapor fino a completo allontanamento del solvente e dell'acido cloridrico in eccesso. Il grezzo è stato sciolto nella minima quantità di CH_2Cl_2 e filtrato per togliere l'eventuale solido disperso.

L'ST1657 è stato precipitato dalla soluzione aggiungendo acetone (da 1,5g di grezzo si è ottenuto 1g di solido precipitato). La resa totale di ST1657 da 3a a è stata del 25%.

$R_f = 0,2$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 8:2).

$T_{\text{dec}} = 230^\circ\text{C}$

MS (IS): $[\text{M}_{\text{ione}}]^+ = 618$.

Analisi elementare; Calcolato: C 60,60, H 6,12, N 10,71;

Trovato: C 60,56, H 6,11, N 10,70.(2% H_2O).

^1H NMR (300 MHz, DMSO, δ): 0,90-1,00 (t, 3H, CH_3), 1,50 (s, 9H, tBu), 2,05-2,20 (q, 2H, CH_2), 2,40-2,50 (q, 2H, CH_2), 2,60-2,70 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 2,70-2,90 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 3,00-3,10 (q, 2H, CH_2), 5,30 (s, 2H, CH_2), 5,50 (s, 2H, CH_2), 7,10 (s, 1H, CH), 7,70-7,80 (t, 1H, CH), 7,85-7,95 (t, 1H, CH), 8,15-8,20 (d, 1H, CH), 8,20-8,30 (t, 1H, NH), 8,55-8,60 (d, 1H, CH), 9,30 (s, 1H, CH).

^{13}C NMR (75,4 MHz, DMSO, δ): 8,3; 27,9; 29,4; 30,4; 31,0; 34,6; 42,9; 53,2; 56,6; 66,9; 71,0; 76,6; 81,3; 95,7; 119,6; 124,9; 125,7; 127,3; 128,9; 130,4; 131,2; 132,5; 144,3; 146,1; 146,4; 149,4; 153,1; 157,0; 168,0; 171,8; 172,2.

ESEMPIO 6

20-O-(benzilglicil)succinil-camptotecina (7b) ST1451

In 5 mL di piridina sono stati sospesi 500 mg (1,44 mmoli) di Camptotecina (1b), 4 g (40 mmoli; 28 eq.) di anidride succinica e dimetil-ammino piridina in quantità catalitica; la miscela è stata agitata a 50°C per 48 h. A reazione completata si sono aggiunti 50 mL di HCl 6N ed il solido così ottenuto è stato ricristallizzato da MeOH per dare 452 mg (1 mmoli; 70%) di un prodotto con $R_f = 0,2$ in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5.

Ad una sospensione di 1 mmole dell'acido così ottenuto in 10 mL di CH_2Cl_2 anidro, raffreddata a $T = 0^\circ\text{C}$, sono stati aggiunti 1,27 g (10 mmoli; 10 eq.) di ossalil cloruro. La miscela è stata lasciata in agitazione per 3 h fino a completa formazione del cloruro acido; dopo aver portato a secco, si riprende con 10 mL di CH_2Cl_2 anidro e si aggiungono 1,65 g (10 mmoli; 10 eq.) di glicina-benzil-estere e 1,5 mL (15 mmoli; 15 eq.) di trietilammina. Dopo 3 h la miscela è stata portata a secco, il residuo è stato ripreso con CH_2Cl_2 e la fase organica così ottenuta è stata lavata con HCl 1N e quindi con H_2O . Il grezzo così ottenuto è stato purificato per cromatografia su colonna di SiO_2 con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5 per dare 400 mg (0,67 mmoli; 67%) di prodotto desiderato. $R_f = 0,38$ in CH_2Cl_2 92:8.

$T_f = 189^\circ\text{C}$.

$\alpha_D = -5,2^\circ$ ($c = 0,44$ in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:2).

MS (IS): $[M+1]^+ = 597$.

Analisi elementare: Calcolato: C 66,55, H 4,87, N 7,06;

Trovato: C 66,52, H 4,86, N 7,05.

^1H NMR (300 MHz, DMSO, δ): 0,95-1,00 (t, 3H, CH_3), 2,10-2,20 (q, 2H, CH_2), 2,40-2,60 (m, 2H, CH_2), 2,65-2,85 (m, 2H, CH_2), 3,90-4,10 (m, 2H, CH_2), 5,00 (s, 2H, CH_2), 5,30 (s, 2H, CH_2), 5,50 (s, 2H, CH_2), 7,10 (s, 1H, CH), 7,25-7,35 (m, 5H, Ph), 7,65-7,80 (m, 2H, 2CH), 8,10-8,20 (q, 2H, 2CH), 8,40-8,50 (t, 1H, NH), 8,70 (s, 1H, CH).

^{13}C NMR (75,4 MHz, DMSO, δ):

7,5; 28,8; 29,4; 30,2; 40,6; 40,7; 50,0; 65,7; 66,1; 75,8; 95,3; 118,6;
127,5; 127,7; 127,8; 127,9; 128,2; 128,4; 128,9; 129,6; 130,2; 131,4;
135,7; 145,4; 145,7; 147,8; 152,3; 156,4; 167,1; 169,7; 170,9; 171,1.

ESEMPIO 7

20-O-(terbutilglicil)succinil-camptotecina bromuro (8b)

ST1453

In 5 mL di piridina sono stati sospesi 500 mg (1,44 mmoli) di Camptotecina (1b), 4 g (40 mmoli; 28 eq.) di anidride succinica e dimetil-ammino piridina in quantità catalitica; la miscela è stata agitata a 50°C per 48 h. A reazione completata si sono aggiunti 50 mL di HCl 6N ed il solido così ottenuto è stato ricristallizzato da MeOH per dare 452 mg (1 mmoli; 70%) di un prodotto con $R_f = 0,2$ in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5.

Ad una sospensione di 1 mmole dell'acido così ottenuto in 10 mL di CH_2Cl_2 anidro, raffreddata a $T = 0^\circ\text{C}$, sono stati aggiunti 1,27 g (10 mmoli; 10 eq.) di ossalil cloruro. La miscela è stata lasciata in agitazione per 3 h fino a completa formazione del cloruro acido; dopo aver portato a secco, si riprende con 10 mL di CH_2Cl_2 anidro e si aggiungono 1,31 g (10 mmoli; 10 eq.) di glicina-tert-butil-estere e 1,5 mL (15 mmoli; 15 eq.) di trietilammina. Dopo 3 h la miscela è stata portata a secco, il residuo è stato ripreso con CH_2Cl_2 e la fase organica così ottenuta è stata lavata con HCl 1N e quindi con H_2O . Il grezzo così ottenuto è stato purificato per cromatografia su colonna di SiO_2 con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5 per dare 390 mg (0,7 mmoli; 70%) di prodotto desiderato. $R_f = 0,4$ in CH_2Cl_2 92:8.

$$T_{\text{dec}} = 213^\circ\text{C}.$$

$$\alpha_D = -52,1^\circ \text{ (c = 0,41 in } \text{CHCl}_3/\text{MeOH } 8:2).$$

$$\text{MS (IS): } [M+1]^+ = 562; M + \text{Na}^+ = 584; [M-1]^- = 560.$$

Analisi elementare; Calcolato: C 64,17, H 5,53, N 7,49;

Trovato: C 64,12, H 5,51, N 7,46.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO, δ): 0,90-1,00 (t, 3H, CH_3), 1,40 (s, 9H, tBu), 2,10-2,20 (q, 2H, CH_2), 2,35-2,55 (m, 2H, CH_2), 2,60-2,85 (m, 2H, CH_2), 3,75-4,00 (m, 2H, CH_2), 5,30 (s, 2H, CH_2), 5,50 (s, 2H, CH_2), 7,20 (s, 1H, CH), 7,70-7,80 (t, 1H, CH), 7,85-7,95 (t, 1H, CH), 8,10-8,15 (d, 1H, CH), 8,20-8,25 (d, 1H, CH), 8,30-8,35 (t, 1H, NH), 8,70 (s, 1H, CH).

$^{13}\text{CNMR}$ (75,4 MHz, DMSO, δ):



7.5; 27.5; 28.9; 29.4; 30.2; 40.3; 41.2; 50.0; 66.1; 75.8; 80.4; 95.4;
118.6; 127.6; 127.9; 128.4; 128.9; 129.7; 130.2; 131.4; 145.4; 145.7;
147.8; 152.3; 156.5; 167.1; 169.0; 170.7; 171.2.

ESEMPIO 8

7-ter-butossiiminometil-20-O-(terbutilglicil)succinil-cam-
ptotecina (8a) ST1616

In 100 mL di CH_2Cl_2 anidro sono stati sciolti 387 mg (0,71 mmoli) di 3a. La soluzione è stata raffreddata in bagno a ghiaccio, quindi sono stati aggiunti 3mL di ossalil cloruro. Terminata l'aggiunta è stato tolto il bagno raffreddante e la reazione è stata lasciata a temperatura ambiente per 6h. A reazione completata, la miscela è stata portata a secco e lavata più volte con CH_2Cl_2 . Al cloruro acido così ottenuto è stata aggiunta una soluzione di glicina tert-butil estere in CH_2Cl_2 , ottenuta liberando con NaOH 2N 1,6 g (9,6 mmoli; 13 eq. rispetto all'iniziale 3a) del corrispondente cloridrato, e 1,6 mL di trietilammia. Dopo 3 h la miscela di reazione è stata diluita con CH_2Cl_2 e lavata con HCl 1N, NaOH 2N e con NaCl_{sat} . La fase organica è stata quindi seccata su sodio solfato anidro e purificata su preparativa ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) per dare 360 mg (0,54 mmoli; 76%) di prodotto finale.

$R_f = 0,47$ in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5.

$T_f = 190^\circ\text{C}$.

$[\text{M}-1]^- = 659$.

Analisi elementare: Calcolato: C 63,64, H 6,06, N 8,48;

Trovato: C 63,67, H 6,09, N 8,51.

^1H NMR (300 MHz, DMSO, δ): 0,95-1,00 (t, 3H, CH_3), 1,40 (s, 9H, tBu), 1,50 (s, 9H, tBu), 2,10-2,30 (q, 2H, CH_2), 2,40-2,60 (m, 2H, CH_2), 2,70-2,90 (m, 2H, CH_2), 3,70-4,00 (m, 2H, CH_2), 5,40 (s, 2H, CH_2), 5,50 (s, 2H, CH_2), 7,20 (s, 1H, CH), 7,70-7,80 (t, 1H, CH), 7,90-8,00 (t, 1H, CH), 8,20-8,25 (d, 1H, CH), 8,30-8,40 (t, 1H, NH), 8,60-8,65 (d, 1H, CH), 9,30 (s, 1H, CH).

^{13}C NMR (75,4 MHz, DMSO, δ):

8,3; 28,0; 28,3; 29,6; 30,1; 31,0; 42,0; 53,1; 66,9; 76,6; 81,2; 81,3;
96,0; 119,5; 124,9; 125,7; 127,2; 128,9; 130,5; 131,0; 132,4; 144,3;
146,1; 146,2; 149,4; 153,1; 157,0; 167,9; 169,8; 171,5; 172,0.

ESEMPIO 9

20-O-(glicil)succinil-camptotecina (7b) (ST1452)

In 3 mL di una miscela di DMF/EtOH 1:1 sono stati sciolti 200 mg (0,34 mmoli) di ST1451; la soluzione è stata addizionata di Pd-BaSO₄ cat e sottoposta ad idrogenazione a 60 psi. Dopo 1 h la reazione è completa. con formazione di un prodotto con $R_f = 0,2$ in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 8:2. Il prodotto è stato purificato su colonna di SiO₂ con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 7:3 per dare 157 mg (0,31 mmoli; 90%) di prodotto atteso.

$T_{\text{dec}} = 255^\circ\text{C}$.

$\alpha_D = -62^\circ$ ($c = 0,4$ in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:2)

MS (IS): $[\text{M}-1]^- = 504$.

Analisi elementare: Calcolato: C 61,78, H 4,87, N 7,06;

Trovato: C 61,74, H 4,82, N 7,10.

^1H NMR (300 MHz, DMSO, δ): 0,90-1,00 (t, 3H, CH_3), 2,10-2,20 (q, 2H, CH_2), 2,35-2,55 (m, 2H, CH_2), 2,65-2,85 (m, 2H, CH_2), 3,75-3,90 (m, 2H, CH_2), 5,30 (s, 2H, CH_2), 5,50 (s, 2H, CH_2), 7,20 (s, 1H, CH), 7,70-7,80 (t, 1H, CH), 7,85-7,95 (t, 1H, CH), 8,10-8,15 (d, 1H, CH), 8,20-8,25 (d, 1H, CH), 8,25-8,30 (t, 1H, NH), 8,70 (s, 1H, CH).

^{13}C NMR (75,4 MHz, DMSO, δ):

8,5; 29,9; 30,4; 31,3; 51,1; 67,2; 76,8; 96,3; 119,7; 128,6; 128,9;
129,4; 130,0; 130,7; 131,2; 132,4; 146,4; 146,8; 148,9; 153,3; 157,5;
168,1; 171,6; 172,2.

ESEMPIO 10

20-O-(2-metossifenilglicil)succinil-camptotecina (8b) ST1454

A 55mg di (7b) ST1452 sciolti in 3 mL di CH_2Cl_2 , sono stati aggiunti 27 mg (0,22 mmoli; 1,8 eq) di dimetilamminopiridina, 150 mg (1,2 mmoli; 10 eq) di guaiacolo e 150 mg (0,73 mmoli; 7 eq) di DCC. La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. La reazione è stata diluita con 10 ml di CH_2Cl_2 , lavata con HCl 1N e seccata su Na_2SO_4 . Il grezzo è stato purificato su preparativa con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98/2. Si ottengono 49 mg di prodotto (0,08 mmoli; 67 %).

$T_f = 180^\circ\text{C}$.

$\alpha_D = -41,1^\circ$ ($c = 0,41$ in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:2).

MS (IS): $[\text{M}+1]^+ = 612$; $\text{M} + \text{Na}^+ = 634$; $\text{M} + \text{K}^+ = 650$.

Analisi elementare: Calcolato: C 64,81, H 4,75, N 6,87;

Trovato: C 64,87, H 4,79, N 6,83.

^1H NMR (300 MHz, DMSO, δ): 0,90-1,00 (t, 3H, CH_3), 2,10-2,20 (q, 2H, CH_2), 2,40-2,60 (m, 2H, CH_2), 2,65-2,85 (m, 2H, CH_2), 3,70 (s, 3H, CH_3), 4,10-4,30 (m, 2H, CH_2), 5,30 (s, 2H, CH_2), 5,50 (s, 2H, CH_2), 6,85-7,00 (m, 2H, $2\times\text{CH}_{\text{ar}}$), 7,05-7,25 (m, 3H, $2\times\text{CH}_{\text{ar}} + \text{CH}_{\text{olef}}$), 7,60-7,70 (t, 1H, CH), 7,75-7,85 (t, 1H, CH), 8,05-8,10 (d, 1H, CH), 8,20-8,25 (d, 1H, CH), 8,45-8,55 (t, 1H, NH), 8,70 (s, 1H, CH).

^{13}C NMR (75,4 MHz, DMSO, δ):

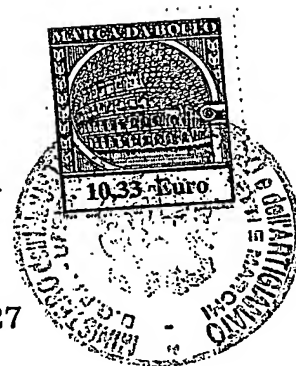
8,5; 25,4; 26,3; 29,8; 30,4; 31,2; 34,3; 48,4; 51,1; 52,7; 67,2; 76,8;
96,3; 113,9; 119,7; 121,5; 123,5; 127,9; 128,6; 128,9; 129,4; 130,0;
130,7; 131,2; 132,4; 146,4; 146,8; 148,9; 151,7; 153,4; 157,5; 169,3;
171,9; 172,2.

ESEMPIO 11

7-ter-butossiiminometil-20-O-(2-metossi-fenilglicil)succin-
il-camptotecina (8a) ST1617

In 3 mL di CH_2Cl_2 anidro sono stati sciolti 180 mg (0,27 mmoli) di ST1616 e alla soluzione sono stati aggiunti 1,5 mL di acido trifluoroacetico. Dopo 3 h a temperatura ambiente la reazione è completa e la miscela è stata portata a secco ed il residuo così ottenuto lavato più volte per eliminare l'eccesso di acido trifluoroacetico.

Il prodotto è stato quindi sciolto in 6 mL di CH_2Cl_2 anidro ed alla soluzione sono stati aggiunti 0,82 mL (7,5 mmoli; 28 eq.) di guaiacolo, 80 mg (0,65 mmoli; 2,4 eq.) di dimetilammino piridina e 410 mg (2 mmoli; 7,4 eq.) di DCC. Dopo 24 h la miscela di reazione



è stata fatta passare su celite ed il grezzo è stato purificato per cromatografia su colonna di SiO₂ con CH₂Cl₂/MeOH 92:8 per dare 85 mg (0,12 mmoli; 44%) di solido giallo. R_f = 0,24 in CH₂Cl₂/MeOH 95:5.

T_{dec} = 170°C.

[M+1]⁺ = 711; M + Na⁺ = 733;

Analisi elementare: Calcolato: C 64,23, H 5,35, N 7,89;

Trovato: C 64,29, H 5,39, 7,84.

¹H NMR (300 MHz, DMSO, δ): 0,95-1,00 (t, 3H, CH₃), 1,50 (s, 9H, tBu), 2,10-2,30 (q, 2H, CH₂), 2,40-2,65 (m, 2H, CH₂), 2,70-2,95 (m, 2H, CH₂), 3,80 (s, 3H, CH₃), 4,15-4,35 (m, 2H, CH₂), 5,40 (s, 2H, CH₂), 5,60 (s, 2H, CH₂), 6,90-7,05 (m, 2H, 2xCH), 7,10-7,30 (m, 3H, 2xCH_{ar} + CH_{olef}), 7,75-7,80 (t, 1H, CH), 7,85-7,90 (t, 1H, CH), 8,30-8,35 (d, 1H, CH), 8,55-8,70 (m, 2H, CH + NH), 9,30 (s, 1H, CH).

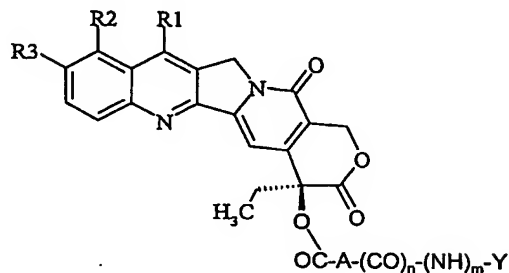
¹³C NMR (75,4 MHz, DMSO, δ):

8,3; 25,1; 26,0; 27,0; 28,7; 29,6; 30,1; 31,0; 34,0; 48,2; 56,4; 76,6;
81,3; 96,0; 113,6; 119,5; 121,2; 123,3; 124,9; 125,7; 127,2; 127,7;
128,9; 130,5; 131,0; 132,4; 144,3; 146,2; 149,4; 151,4; 157,0; 157,3;
167,9; 169,0; 171,7; 172,0.

RIVENDICAZIONI

RM 2002 A 000306

1. Composti di formula (I)



(I)

dove:

A è C₁-C₈ alchile lineare o ramificato saturo o insaturo, C₃-C₁₀ cicloalchile, C₃-C₁₀ cicloalchile-C₁-C₈ alchile lineare o ramificato; quando n e m sono uguali a 1, allora Y è C₁-C₈ alchile lineare o ramificato saturo o insaturo sostituito con NR₁₂R₁₃ o N⁺R₁₂R₁₃R₁₄, dove R₁₂, R₁₃ e R₁₄, uguali o diversi fra loro, sono idrogeno o C₁-C₄ alchile lineare o ramificato, oppure Y è BCOOX, dove B è un residuo di un amminoacido, X è H, C₁-C₄ alchile lineare o ramificato, benzile o fenile, sostituiti nelle posizioni disponibili con almeno un gruppo scelto tra C₁-C₄ alcossi, alogeno, nitro, ammino, C₁-C₄ alchile, oppure se n e m sono entrambi 0;

Y è 4-trimetilammonio-3-idrossi-butanoil, sia sotto forma di sale interno, sia sotto forma di sale con un anione di un acido farmaceuticamente accettabile, oppure Y è N⁺R₁₂R₁₃R₁₄, come definiti sopra;

R₁ è idrogeno oppure un gruppo -C(R₅)=N-O-R₄, nel quale R₄ è idrogeno oppure un gruppo C₁-C₅ alchile o C₁-C₅ alchenile, lineare

o ramificato, o C₃-C₁₀ cicloalchile, o (C₃-C₁₀) cicloalchile - (C₁-C₅) alchile lineare o ramificato, o C₆-C₁₄ arile, o (C₆-C₁₄) arile - (C₁-C₅) alchile lineare o ramificato, o un gruppo eterociclico o eterociclo - (C₁-C₅) alchile lineare o ramificato, detto gruppo eterociclico contenente almeno un eteroatomo scelto fra atomo di azoto, eventualmente sostituito con un gruppo (C₁-C₅) alchile, e/o ossigeno e/o zolfo; detti gruppi alchile, alchenile, cicloalchile, cicloalchilalchile, arile, arile-alchile, eterociclico o eterociclo-alchile, potendo essere eventualmente sostituiti con uno o più gruppi scelti fra: alogeno, idrossi, C₁-C₅ alchile, C₁-C₅ alcossi, fenile, ciano, nitro, -NR₆R₇, dove R₆ e R₇, uguali o diversi fra loro sono idrogeno, (C₁-C₅) alchile lineare o ramificato, il gruppo -COOH o un suo estere farmaceuticamente accettabile; oppure il gruppo -CONR₈R₉, dove R₈ e R₉, uguali o diversi fra loro sono idrogeno, (C₁-C₅) alchile lineare o ramificato; oppure R₄ è un residuo (C₆-C₁₀) aroile o (C₆-C₁₀) aril-solfonile, eventualmente sostituito con uno o più gruppi scelti fra: alogeno, idrossi, C₁-C₅ alchile lineare o ramificato, C₁-C₅ alcossi lineare o ramificato, fenile, ciano, nitro, -NR₁₀R₁₁, dove R₁₀ e R₁₁, uguali o diversi fra loro sono idrogeno, C₁-C₅ alchile lineare o ramificato; oppure R₄ è un residuo poliamminoalchile; oppure R₄ è un residuo glicosilico; R₅ è idrogeno, C₁-C₅ alchile, lineare o ramificato, C₁-C₅ alchenile, lineare o ramificato, C₃-C₁₀ cicloalchile, (C₃-C₁₀) cicloalchile - (C₁-C₅) alchile lineare o ramificato, C₆-C₁₄ arile, (C₆-C₁₄) arile - (C₁-C₅) alchile lineare o ramificato; R₂ e R₃, uguali o diversi fra loro sono idrogeno, ossidrile, C₁-C₅ alcossi, lineare o ra-

mificato; gli N1-ossidi, le miscele racemiche, i loro singoli enantiomeri, i loro singoli diastereoisomeri, le loro miscele, i sali farmaceuticamente accettabili.

2. Composti secondo la rivendicazione 1, nei quali, nella formula (I), n e m sono 1.
3. Composti secondo la rivendicazione 1, nei quali, nella formula (I), n e m sono 0.
4. Composti secondo la rivendicazione 1, scelti nel gruppo costituito da:

(E)-7-tert-butossiiminometil-20-O-(4-trimetilammonio-3-idrossi)butanoil-camptotecina bromuro;

(E)-7-tert-butossiiminometil-20-O-(4-trimetilammonio)butanoil-camptotecina bromuro;

(E)-7-tert-butossiiminometil-20-O-emisuccinil-camptotecina;

(E)-7-tert-butossiiminometil-20-O-[2-(dimetilamino)etilammino]succinilcamptotecina cloridrato;

20-O-(benzilglicil)succinil-camptotecina;

20-O-(terbutilglicil)succinil-camptotecina bromuro;

7-ter-butossiiminometil-20-O-(terbutilglicil)succinil-camptotecina;

20-O-(glicil)succinil-camptotecina;

20-O-(2-metossifenilglicil)succinil-camptotecina;

7-ter-butossiiminometil-20-O-(2-metossi-fenilglicil)succinil-camptotecina.



5. Procedimento per la preparazione dei composti della rivendicazione 1, dove n e m sono 0, che comprende:

a) reazione della camptotecina, eventualmente sostituita con i gruppi R_1 , R_2 e R_3 definiti sopra, con un acido carbossilico recante in ω un gruppo uscente, a dare il relativo estere in 20;

b) sostituzione di detto gruppo uscente con il gruppo Y.

6. Procedimento per la preparazione dei composti della rivendicazione 1, dove n e m sono 1, si ottengono attraverso un procedimento che comprende:

a) reazione della camptotecina, eventualmente sostituita con i gruppi R_1 , R_2 e R_3 definiti sopra, con un acido bicarbossilico avente da 3 a 11 atomi di carbonio, a dare il relativo emiestere in 20;

b) trasformazione del gruppo carbossilico libero di detto emiestere nella relativa amide -NH-Y.

7. Composti secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, come medicinali.

8. Composizione farmaceutica comprendente una quantità terapeuticamente efficace di almeno un composto delle rivendicazioni 1-4, in miscela con veicoli ed eccipienti farmaceuticamente accettabili.

9. Composizione farmaceutica comprendente una quantità terapeuticamente efficace di almeno un composto delle rivendicazioni 1-4, in miscela con veicoli ed eccipienti

farmaceuticamente accettabili ed eventualmente in associazione con un altro principio attivo.

10. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 9, nella quale l'altro principio attivo è un antitumorale.

11. Uso di un composto delle rivendicazioni 1-4, per la preparazione di un medicamento ad attività di inibizione della Topoisomerasi I.

12. Uso secondo la rivendicazione 11, per la preparazione di un medicamento utile per il trattamento di tumori.

13. Uso secondo la rivendicazione 11, per la preparazione di un medicamento utile per il trattamento di infezioni parassitarie o virali.

p.i. di SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.

e di ISTITUTO NAZIONALE PER LO STUDIO E
CURA DEI TUMORI

Dott. Marco SPADARO

